

**【结果】** hESCs 培养 6 d 后可于饲养层上形成类圆形克隆团,在悬浮培养基中悬浮培养形成 EBs。EBs 于角膜基质成纤维细胞饲养层上与人晶状体上皮细胞系共培养,EB 面积逐渐增大,中央部分形态发生变化,形成单层排列的多边形细胞。免疫荧光检测,可表达类角膜内皮细胞标记物  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase。类角膜内皮细胞接种于 APCM 支架培养,H-E 染色证实后弹力层表面形成单层类角膜细胞结构。

**【结论】** 目前已经完成了 hESC、人角膜基质成纤维细胞和人晶状体上皮细胞系的培养。实现了 hESCs 向角膜内皮细胞的诱导分化。完成了 APCM 的制备和鉴定。并成功以 hESC 和 APCM 构建了组织工程角膜内皮植片。植片的功能有待动物实验进一步研究。

**关键词:** 人胚胎干细胞;角膜内皮细胞;分化

## A-S2-34

# 基于 DBP 的脑血栓患者阿司匹林用药前后蛋白质组学研究

李宗泽<sup>1</sup>,李子全<sup>2</sup>,王苗苗<sup>1</sup>,马永琛<sup>3</sup>;指导教师:刘师莲

1. 山东大学 2010 级临床医学五年制
2. 山东大学 2009 级临床医学五年制
3. 山东大学 2009 级临床医学七年制

**【目的】** 寻找并鉴定脑血栓患者阿司匹林用药前后差异表达的血浆特异蛋白,探讨阿司匹林与维生素 D 结合蛋白(Vitamin D binding protein, DBP)相互作用进而预防血栓形成的详细机制,筛选与 DBP 清除血栓作用相关的候选蛋白,形成网络级联。

**【方法】** 于潍坊市益都中心医院获取初发脑血栓患者血浆样本 18 例[男性 9 例,女性 9 例,平均年龄(58.11±7.95)岁]。将 18 例患者随机分为 3 组(性别、年龄相匹配),分别混合 3 组用药前后血浆样本,构建 6 组样品池。针对样品池进行蛋白质提取及定量后,行固相 PH 双向凝胶电泳(2-DE)。运用 ImageMaster 2D Elite 6.0 软件比对用药前后 2-DE 图谱,基于蛋白质点灰度与体积变化,选取差异表达蛋白质点进行基质辅助激光解析电离化飞行时间质谱法(MALDI-TOF/MS)和串联质谱法(MS/MS)分析以鉴定蛋白质,并对差异蛋白应用 IPA(Ingenuity Pathway Analysis)软件构建生物信号网络图谱。运用蛋白质印迹法验证用药前后血浆中 DBP 和肌动蛋白(actin)的表达差异。应用免疫共沉淀法验证 DBP 与 actin 相互作用。

**【结果】** 针对考马斯亮蓝染色得到的 2-DE 图谱,ImageMaster 2D Elite 6.0 软件共筛选出 1 256 个蛋白点,其中 228 个具有表达量的差异。筛选差异超过 1.5 倍的 30 个蛋白质点进行质谱分析得到 28 项检测结果(比对概率分数大于 55 分的结果有意义),包括 DBP 及与 DBP 作用相关联的 11 种差异蛋白:actin、结合珠蛋白、Fibrinogen gamma chain 等。蛋白质印迹结果发现,DBP 用药后(114.04±16.69)较用药前(66.33±5.61)表达显著上调,actin 则由(185.39±3.09)下调至(99.34±10.65)(两者  $P$  均  $<0.01$ ),与 2-DE 结果相一致。免疫共沉淀结果证实 DBP 与 actin 可直接作用,形成复合物。

**【结论】** 脑血栓疾病具有发病率高、致残率高、死亡率高的特点,本实验采用临床样本,针对阿司匹林与 DBP 在预防血栓形成作用机制中的争论点,首次在中枢系统发现阿司匹林与 DBP 存在相互作用,使 DBP 表达上调,从而结合血浆 actin 防止其进一步聚合,发挥预防血栓形成的作用,DBP 可作为预防心脑血管血栓性疾病的靶点应用于临床实验与治疗。此外,本实验筛选出 DBP 作用相关蛋白质,通过 IPA 显示 Fibrinogen gamma chain 与 AT-III 作用直接相关,可为阿司匹林预防和治疗血栓形成提供作用靶点。

**关键词:** 阿司匹林(乙酰水杨酸);脑血栓;DBP;血浆蛋白质组学